

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Predicción de la composición química de Rye grass
mediante el uso de espectroscopia de reflectancia en el
infrarrojo cercano (NIRS)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Betty Soledad Zamudio Bravo

ASESOR

Felipe San Martin Howard

Lima - Perú

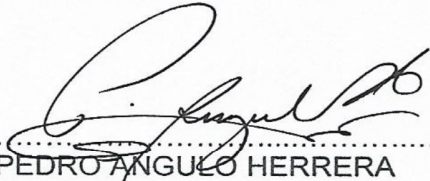
2016




UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 142-EPMV/FMV-2016

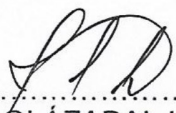
PRESIDENTE :


PEDRO ÁNGULO HERRERA

MIEMBROS :

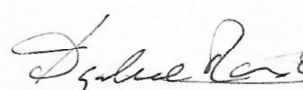

FELIPE SAN MARTÍN HOWARD
Asesor de la Tesis


DAPHNE RAMOS DELGADO


JUAN OLÁZABAL LOAIZA

San Borja, 07 de noviembre de 2016

V° B°


Dra. DAPHNE RAMOS DELGADO
Directora de la Escuela Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día lunes **07 de noviembre de 2016**, a las **16:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **142-EPMV/FMV-2016**, integrado por los siguientes profesores:

PEDRO ANGULO HERRERA
FELIPE SAN MARTIN HOWARD
DAPHNE RAMOS DELGADO
JUAN OLÁZABAL LOAIZA

Presidente del Jurado
Asesor de la Tesis
Miembro del Jurado
Miembro del Jurado

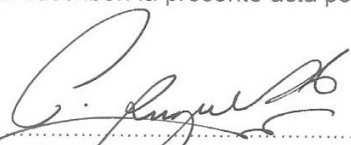
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **ZAMUDIO BRAVO, BETTY SOLEDAD**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:


“PREDICCIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE RYE GRASS MEDIANTE EL USO DE ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA EN EL INFRARROJO CERCANO (NIRS)”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIESESETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **16:45 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuádruplicado los integrantes del Jurado:


Pedro Angulo Herrera: Dr. Prof. Principal, T.C


Felipe San Martín Howard: PhD. Prof. Principal, D.E


Daphne Ramos Delgado: Dra. Prof. Asociada, D.E


Juan Olazabal Loaiza: Mg. Prof. Asociado, T.C.

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado en primer lugar a mis padres Jorge y Carmen quienes siempre depositaron su confianza en mí y siguieron cada uno de mis pasos a lo largo de mi carrera universitaria, contribuyendo con su cariño, consejos y ejemplo para desarrollarme como profesional y como persona.

En segundo lugar, este trabajo está dedicado a mi alma máter, la decana de América, de la que me siento sumamente orgullosa de pertenecer.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Jorge y Carmen por sus consejos, su cariño y confianza puestas en mí.

A mi asesor Felipe San Martín por su paciencia y grandes enseñanzas.

A Juan Olazábal por sus consejos y paciencia.

A Vladimir por su comprensión y confianza en mí

A toda mi familia por ser siempre mi motivo de alegría.

CONTENIDO

Agradecimientos	i
Contenido	ii
Resumen	iv
Abstract.....	v
Lista de cuadros	vi
Lista de figuras	vii
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Rye grass	4
2.2 Métodos para determinar composición química.	5
2.2.1 <i>Proteína Cruda</i>	6
2.2.2 <i>Fibra Bruta</i>	7
2.2.3 <i>Extracto Etéreo</i>	8
2.2.4 <i>Ceniza</i>	8
2.3 Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarojo Cercano (NIRS).....	9
2.3.1 <i>Bases químicas y físicas</i>	9
2.3.2 <i>Calibración</i>	12
2.3.3 <i>Uso de técnica de NIRS para predicción de composición de alimentos</i>	12
2.3.4 <i>Transformación de espectros y cálculo de ecuaciones</i>	14
2.3.4.1 Desarrollo de calibraciones.....	14
2.3.4.2 Cálculo de ecuaciones.....	16
2.3.4.3 Criterio de selección de ecuaciones	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19

3.1	Localización.....	19
3.2	Características de la muestra.....	20
3.3	Análisis Proximal.....	20
3.4	Metodología NIRS	20
3.4.1	<i>Preparación de muestras</i>	20
3.4.2	<i>Ecuación de calibración</i>	21
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1	Análisis Proximal.....	23
4.2	Calibración.....	25
V.	CONCLUSIONES.....	30
VI.	RECOMENDACIONES	31
VII.	BIBLIOGRAFÍA	32
Anexo..	38

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo predecir la composición química de Rye grass mediante el uso de espectroscopia de reflectancia infrarrojo cercano, se analizaron 29 muestras de Rye grass con diferentes tiempos de crecimiento, provenientes del valle del Mantaro ubicado a 3,200 metros de altitud. Se realizaron análisis proximal, luego se tomaron los espectros y se desarrollaron ecuaciones de calibración usando los métodos de mínimos cuadrados parciales y Regresión de componentes principales, aplicando previamente diferentes transformaciones matemáticas de los datos espectrales. Los estadísticos obtenidos para proteína cruda, fibra bruta, extracto etéreo y ceniza tuvieron coeficientes de determinación de 0.96, 0.90, 0.83 y 0.95, respectivamente. Los modelos matemáticos obtenidos muestran que la técnica NIRS resulta satisfactoria para la determinación de dichos parámetros.

Palabras clave: Proteína cruda, Fibra bruta, Extracto etéreo, ceniza, NIRS, Rye grass.

ABSTRACT

The present study had as objective to predict the chemical composition of Rye grass by using near infrared reflectance spectroscopy, 29 samples of rye grass with different times of growth, from the Mantaro Valley, located up 3200 meters of altitude, were analyzed. It was made the proximal analysis, then the spectrum was taken and calibration equations were developed using the methods Partial Least Squares Regression and main components, previously applying different mathematical transformations to the spectral data. The statistics obtained for crude protein, crude fiber, ether extract and ash determination coefficients were 0.96, 0.90, 0.83 and 0.95, respectively. The obtained mathematical models show that the NIRS technique is satisfactory for the determination of these parameters.

Keywords: Crude protein, crude fiber, ether extract, ash, NIRS, Rye grass.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química del Rye Grass.	5
Cuadro 2. Bandas de absorción de enlaces químicos en la región NIRS.	11
Cuadro 3. Composición química (%) de las muestras de Rye grass analizadas.	24
Cuadro 4. Ecuaciones de calibración.	26
Cuadro 5. Comparativo de valores analizados con método proximal y NIRS.	28
Cuadro 6. Composición química (%) de las muestras de Rye grass evaluadas mediante análisis proximal.	39
Cuadro 7. Diferencia de contenido de ceniza hallado por análisis proximal y por NIRS.	45
Cuadro 8. Diferencia entre contenido de PC hallado por análisis proximal y por NIRS.	47
Cuadro 9. Diferencia entre contenido de EE hallado por análisis proximal y por NIRS.	49
Cuadro 10. Diferencia entre contenido de FB hallado por análisis proximal y por NIRS.	51
Cuadro 11. Estadísticos de calibración obtenidos por MPLS y PCR para la estimación de PC, FB, EE y cenizas.	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- Compendio de espectros analizados.	25
FIGURA 2.- a) Curva de calibración de proteína cruda.	41
FIGURA 2.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de proteína cruda.	41
FIGURA 3.- a) Curva de calibración de fibra bruta.	42
FIGURA 3.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de fibra bruta.	42
FIGURA 4.- a) Curva de calibración de extracto etéreo.	43
FIGURA 4.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de extracto etéreo.	43
FIGURA 5.- a) Curva de calibración de ceniza.	44
FIGURA 5.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de ceniza.	44

I. INTRODUCCIÓN

La nutrición animal es la ciencia que estudia las necesidades en nutrientes de cada animal y establece los alimentos más convenientes para satisfacerlas, una vez conocidos su composición en nutrientes y el metabolismo de estos en el animal (Church *et al.*, 2002).

El control analítico de los alimentos y productos es un punto crítico en lo que se refiere a la aplicación práctica de los conocimientos científicos generados en el campo de la nutrición animal. Los métodos tradicionales de análisis, cuantitativos y cualitativos, son laboriosos, demandan tiempo, mano de obra y son de elevado costo. Por esto, se hace necesario desarrollar técnicas rápidas y confiables que permitan evaluar los alimentos, así como controlar la calidad de los productos agropecuarios (Davies y Grant, 1987).

Las gramíneas son uno de los grupos más numerosos e importantes de los pastos cultivados y silvestres, con más de 10 000 especies y tiene una amplia adaptación a condiciones climáticas específicas (Bojórquez *et al.*, 2015). Estas plantas dentro de la alimentación son fuentes energéticas, elemento necesario para la producción animal (Ordoñez *et al.*, 2011).

Desde la década del setenta del siglo XX, se perfila a nivel mundial la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS), como una técnica alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales. Esta presenta muy buen potencial para obtener estimaciones seguras y muy rápidas en lo que se refiere a la composición química y nutricional de los forrajes así como de otros productos de muy diversa procedencia (Givens y Deaville, 1999, Cazzolino, 2002).

El NIRS es una técnica rápida, no destructiva ni contaminante, y de gran exactitud siempre que se sigan los procedimientos adecuados para crear las ecuaciones de calibración (Cazzolino *et al.*, 2006). Los equipos con esta tecnología no vienen preparados para utilizar inmediatamente en rutina analítica. Es preciso relacionar alimentos patrón analizados previamente por otros métodos (vía húmeda) con sus espectros, a este proceso se denomina "calibración" (De La Roza, 1993). Por esta razón se plantea este trabajo con el objetivo de predecir la composición química de rye grass mediante el uso de espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la alimentación de rumiantes, participan un sin número de factores los cuales tienen un efecto mayor o menor sobre la respuesta animal, dependiendo de su participación en este proceso para transformar alimentos fibrosos como los forrajes, residuos de cosecha y otros no empleados en la alimentación de humanos hasta la obtención de productos como carne, leche o lana (Fernández *et al.*, 2010).

La alimentación animal en la sierra del país en piso de valle, consiste de forrajes cultivados, permanentes y estacionales, forrajes no cultivados, subproductos agrícolas y residuos agroindustriales (Alagón, 2002). Las pasturas cultivadas, tanto permanentes como temporales (anuales), son los alimentos más baratos y prácticos que se pueden producir en las zonas ganaderas de la sierra peruana.

2.1. Rye grass

El Rye grass es un forraje nativo de Europa, Asia y África del Norte, siendo una de las pasturas más cultivadas en el mundo. Son considerados forrajes de alta calidad y su alta digestibilidad los convierte en los más adecuados para la alimentación de todos los tipos de rumiantes. Posee numerosas cualidades agronómicas muy deseables, estableciéndose rápidamente y tienen un crecimiento largo por temporada, obteniéndose alto rendimiento en ambientes favorables y alimentados con nutrientes adecuados, poseen alto contenido de nutrientes. Pueden ser pastoreados y se utiliza para heno o ensilaje. Estas pasturas son grandes consumidores de agua y su rendimiento es inferior al óptimo durante una sequía o períodos prolongados de temperaturas extremas (Hall, 1992). Las condiciones climáticas imperantes en la sierra del Perú, y particularmente en los valles interandinos, son inmejorables para el cultivo de los pastos introducidos, procedentes de zonas templadas. (Bojórquez *et al.*, 2015).

Rye grass italiano (*Lolium multiflorum*)

En lo que respecta a su adaptación, es ideal para valles interandinos de hasta 3,800 m.s.n.m., prospera en suelos de mediana fertilidad y buena aireación. Su rendimiento se calcula entre 16-18 T de MS/ha/año y con 16 a 18 % de proteína cruda. Entre sus cualidades, cabe destacar las hojas medianas muy palatables con alto contenido de carbohidratos (energía). Entre las variedades tetraploides se tiene: “Tama”, “Bestfor”, “Magnum”, “Westerwoldicum”, “Concord”, etc. (SOLID OPD, 2010).

La composición química del Rye grass, se presenta en el Cuadro 1, tomándose en cuenta el valor relativo del forraje se clasifica en cinco categorías. Siendo el de categoría excelente aquel forraje con alto contenido de proteína cruda y extracto etéreo

y el de menor categoría (cuarta) aquel que presenta mayor contenido de ceniza y fibra y menor contenido de proteína y extracto etéreo.

Cuadro 1. Composición química del Rye Grass (%MS)

VRF ¹	Cenizas (%)	Proteína cruda (%)	Extracto etéreo (%)	Fibra bruta (%)
Excelente (>151)	12.4	19.7	3.99	19.1
Primera (125-151)	12.8	14.4	3.23	23.3
Segunda (103-124)	13.2	12.0	2.56	26.6
Tercera (87-102)	12.4	10.4	2.29	30.4
Cuarta (75-86)	14.4	8.00	2.33	32.3

¹Valor relativo del forraje = $[(88.9 - (0.779 \times \text{FAD}\%)) \times (120 / \text{FND}\%)] / 1.29$

Fuente: Calsamiglia y Ferret, 2004

2.2. Métodos para determinar composición química.

El método para determinar la composición química de los forrajes se basa en el sistema proximal de los alimentos que se diseñó a mediados del siglo XIX en la estación experimental de Weende, Alemania (Henneberg y Stohmann, 1860, 1864; citado por Greenfield y Southgate, 2003). Se creó para obtener una clasificación muy amplia y con un nivel máximo de los componentes de alimentos. El sistema consiste en la determinación analítica del agua (humedad), cenizas, grasa bruta (extracción con éter), proteína bruta y fibra bruta. El extracto libre de nitrógeno (ELN) representa más o

menos los azúcares y almidones, se calcula por diferencia en lugar de medirlo mediante análisis (Greenfield y Southgate, 2003).

Aunque algunos de los métodos utilizados tradicionalmente en el sistema proximal de análisis no se recomiendan para la preparación de bases de datos de composición de alimentos (por ejemplo, la fibra bruta), es conveniente examinar los conceptos aplicados, puesto que son los que han predominado en las opiniones sobre la composición de alimentos y su análisis. Este sistema se creó en un momento en el que sólo se conocía en parte la química de la mayoría de los componentes de los alimentos. El desarrollo de las ciencias de la nutrición ha demostrado que para los estudios nutricionales se necesita un enfoque más detallado y con una orientación más bioquímica con respecto al análisis de los alimentos. No obstante, el análisis proximal, incluidos los métodos originales, sigue constituyendo la base del análisis de los alimentos con fines legislativos en muchos países (Greenfield y Southgate, 2003).

El “Análisis de Weende” no define la cantidad de nutrientes de un alimento, sino es un índice del valor nutritivo, puesto que las fracciones aisladas están correlacionadas con alguna de las propiedades del alimento que tengan importancia nutricional. Por tanto, es una herramienta descriptiva útil para establecer las características de un alimento y su correcto uso requiere de otros juicios y conocimientos nutricionales (Cañas, 1998).

2.2.1. Proteína cruda (PC)

Para determinar la PC de un alimento se debe someter la MS al método Kjeldahl, cuya modificación, el micro Kjeldahl permite igualar con precisión y menor gasto de reactivos. El método consiste básicamente en tres pasos (Pond *et al.*, 2010; Agudelo, 2001; AOAC, 1990):

- a. Digestión de la muestra en ácido sulfúrico con un catalizador, hasta convertir todo el nitrógeno a la forma amoniacal.
- b. Destilación del sulfato amónico en una solución atrapadora.
- c. Cuantificación del amoniaco por valoración con una solución estándar.

Una vez conocido el contenido de nitrógeno en la muestra, se multiplica por el factor de conversión 6.25 que nos aproxima al contenido de PC (AOAC, 1990)

El análisis de PC no diferencia una forma de nitrógeno de otra, por lo que no es posible determinar si una mezcla de alimento contiene urea o proteína de la más alta calidad. Además, éste procedimiento no convierte el nitrógeno que se halla en forma de nitratos en sales de amonio, de modo que el nitrógeno que se halla en este estado queda excluido. Los componentes nitrogenados más importantes del forraje son las proteínas y aunque el contenido en proteína total disminuye con la madurez, las proporciones relativas de aminoácidos no se alteran mucho (Pond *et al*, 2010).

La fracción nitrogenada no proteica (NNP) de la planta varía con el estado fisiológico de la planta, cuanto más favorables son las condiciones de crecimiento, más alto es el contenido en NNP, así como el valor nitrógeno total y a medida que la planta madura, decrecen ambos (McDonald *et al.*, 2006).

2.2.2. Fibra bruta (FB)

La cantidad de FB, se determina hirviendo una muestra que se ha sometido a extracción con éter, primero con ácido diluido y luego en una base diluida; posteriormente, se filtra, se seca y se quema en un horno. La fracción de la fibra cruda

es la diferencia entre el peso antes y después de quemar la muestra; este es un proceso tedioso de laboratorio que no es muy repetible; se trata de un intento de imitar el proceso digestivo que ocurre primero en el estómago gástrico y luego en el intestino delgado de los animales, la fibra cruda, está formada principalmente por carbohidratos estructurales vegetales, como celulosa y hemicelulosa, y lignina, que es una sustancia muy poco digerible presente en la porción fibrosa de los tejidos vegetales (Pond *et al.*, 2010).

2.2.3. Extracto etéreo o grasa cruda (EE)

Este procedimiento requiere que las muestras molidas se sometan a extracción con éter dietílico por un periodo de 4 horas o más (AOAC, 1990). Las sustancias solubles en éter incluyen una gran variedad de compuestos orgánicos, de los cuales solamente algunos tienen valor nutritivo, los que tienen importancia cuantitativa incluyen las grasas verdaderas y los esterres de los ácidos grasos, algunos lípidos compuestos y las vitaminas o provitaminas liposolubles, como los carotenoides. La principal razón de obtener EE, es aislar una fracción de los forrajes que tenga un elevado valor calórico. Este método podría ser válido si el EE está formado principalmente por grasas y esterres de ácidos grasos, si el extracto contiene porcentajes elevados de ceras vegetales, aceites esenciales, resinas u otros compuestos similares, esta prueba tendrá poco significado, ya que los compuestos como estos son de poco valor nutritivo para los animales (Pond *et al.*, 2010).

2.2.4. Ceniza

La determinación del contenido de ceniza consiste en la oxidación de toda la materia orgánica contenida en la muestra, sometiéndola a una combustión en un horno a 600°C durante 2 horas, hasta conseguir una ceniza blanquecina (AOAC, 1990).

2.3. Espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

La palabra espectroscopia se deriva de la combinación latina de spectrum ‘imagen’ y del griego skopia ‘ver’, de manera que la espectroscopia infrarroja es un tipo de espectroscopía vibracional, que permite el análisis de las vibraciones moleculares. Específicamente, la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) es la medición de la longitud de onda e intensidad de la absorción de luz infrarroja cercana, que realizan determinados componentes químicos de la muestra. (Valenciaga y Saliba, 2006).

A partir de la década del setenta se perfila a nivel mundial el uso del NIRS, como una técnica alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales, con muy buen potencial para obtener estimaciones seguras y muy rápidas de la composición química nutricional de forrajes (De la Roza, 1993), así como de otros productos de muy diversa índole. Esta es una técnica no destructiva, rápida, de gran precisión y exactitud, siempre que se sigan los procedimientos adecuados para generar las ecuaciones de predicción (Alomar y Fuchslocher, 1997).

2.3.1. Bases químicas y físicas

La luz infrarroja cercana se extiende en un rango de 700 nm – 2500 nm y tiene energía suficiente para excitar sobretonos y combinaciones de vibraciones moleculares a altos niveles de energía (Deaville y Flinn 2000).

Es usado básicamente para medir de forma cuantitativa grupos funcionales orgánicos, especialmente O-H, N-H y C=O, cuando la luz incide en una muestra, una parte de los fotones puede transmitirse a través de la misma, y el resto se absorbe por

algunos enlaces covalentes que actúan como resortes oscilantes, acoplados con la frecuencia o longitud de onda exacta de la radiación lumínica (Cajarville *et al.*, 2003). Al absorber energía, los enlaces de las moléculas vibran en dos formas fundamentales: se extienden, aumentando la distancia interatómica a lo largo del eje entre dos átomos (lo que ocurre a frecuencias más altas o a menor longitud de onda), o se doblan (a frecuencias más bajas o mayor longitud de onda) cambiando el ángulo de enlace entre dos átomos (Alomar y Fuchslocher, 1998). La energía resultante se disipa y se provoca un calentamiento de la muestra. La absorción es selectiva y depende de los grupos moleculares involucrados. Así, la absorción de luz se estima por diferencia entre la luz incidente y la reflejada o transmitida. La interacción de la energía con la materia obedece a la ley de Lambert-Beer, la cual establece que la absorbancia, a cualquier longitud de onda, es proporcional al número o concentración de las moléculas absorbentes presentes en el camino que recorre la radiación (Cozzolino *et al.*, 2003). Esto determina que, para una muestra de naturaleza química heterogénea, o con numerosos componentes químicos, el espectro obtenido en la región del infrarrojo cercano sea una compleja combinación de bandas sobrepuestas o muy cercanas, o picos de absorción parciales. Estos suelen confundirse en una línea suavizada, en la que se encuentran picos, valles y curvaturas en forma de hombros (Alomar y Fuchslocher, 1998 y Deaville y Flinn 2000) y que sólo tienen sentido cuando dicha información se puede interpretar con la ayuda de una computadora. En su aplicación al análisis de forrajes y otros compuestos, la técnica se basa en que el espectro lumínico cercano al infrarrojo puede proporcionar información acerca de los principales elementos estructurales asociados a los organismos vivos, ya que los grupos funcionales que responden a la radiación en este espectro son C-H, O-H, N-H, S-H y C=O (Shenk y Westerhaus, 1995). Así, los principales componentes del tejido vegetal, que consisten en combinaciones muy diversas de los grupos citados, tienen propiedades de absorción en esta región del espectro (Cozzolino *et al.*, 2002), que pueden usarse para diferenciar un componente de otro.

En la Cuadro 2, se presentan las bandas de absorción de los principales componentes orgánicos en los alimentos y los enlaces tentativos que los representan. Una de las ventajas del trabajo en la región del infrarrojo cercano del espectro es que, al

utilizar longitudes de ondas menores (en relación al infrarrojo medio), la penetración de la radiación es mayor, debido a que el grado de absorción es más débil, con respecto a la banda de absorción fundamental en el sector del infrarrojo medio. Esto hace posible analizar por reflectancia una muestra sólida de mayor grosor, obteniendo información más representativa y, al mismo tiempo, permite trabajar en modo transmisión (o transmitancia) muestras húmedas heterogéneas más gruesas y que sea más fácil el manejo que en la región del infrarrojo medio (Beyer, 1997).

Cuadro 2. Bandas de absorción de enlaces químicos en la región NIRS

Longitud de onda, nm	Constituyentes	Enlace asignado
1200	Lípidos	C-H
1440	Agua y Carbohidratos	O-H
1730	Lípidos	C-H
1780	Lípidos	C-H
1940	Agua	O-H
1980	Proteínas	N-H
2080	Carbohidratos	O-H
2180	Proteínas	C=O, N-H
2320	Lípidos	C-H
2350	Lípidos	C-H

(Fuente: Davies y Grant, 1987)

2.3.2. Calibración

Un proceso de calibración es la creación de un modelo matemático que relaciona la respuesta del instrumento con la composición química o "calidad" de la muestra medida. Dada la sofisticación de los equipos instrumentales se generan miles de medidas individuales a distintas longitudes de onda. Por consiguiente es necesario el apoyo de potentes paquetes estadísticos para procesar los datos, y puesto que se trata de una tecnología muy reciente aparecen de continuo nuevas posibilidades (De La Roza, 1993).

El éxito de la técnica puede atribuirse, en gran parte, a su habilidad para la realización del análisis de rutina rápido, con alta repetitibilidad, reproducibilidad y exactitud en laboratorios de nutrición animal. Esto permite tomar decisiones rápidamente. Requiere además, una nula o escasa preparación de la muestra (análisis no destructivo de las muestras) e implica un ahorro considerable de reactivos. No genera residuos químicos contaminantes (tecnología limpia) (Valenciaga y Saliba, 2006).

2.3.3. Uso de técnica de NIRS para predicción de composición química en alimentos

Existen muchas experiencias sobre el uso del NIRS en la valoración de diversos insumos para producción animal; así se tiene, que para el caso de *Pennisetum purpureum* las ecuaciones de calibración para la materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácida (FDA), celulosa, hemicelulosa, lignina, ceniza y digestibilidad *in vitro* de la MS fueron apropiadas, no sólo por tener un error estándar de calibración bajo, sino también por el alto valor del coeficiente de determinación (Valenciaga *et al.*, 2007).

La valoración de diversos henos mediante el NIRS para predecir PC y ceniza fue buena; regular para FDN e inferiores para FDA y MS (Cazzolino, 2006); así mismo, al evaluarse la PC de henos utilizados por productores de ganado de Florida – Estados Unidos, se obtuvieron coeficientes de correlación de 90, 91, 87, 92 y 92 %, para Bermuda, Star, Digit, Bahía y mixtura de forrajes, respectivamente (Brown *et al.*, 1990).

El uso del NIRS en pastos cultivados tropicales de América Central permitió obtener altos coeficientes de determinación (R^2) y bajos errores estándar de validación (EEV) para PC, FDA y FDN (Sandoval *et al.*, 2008). El análisis de PC mediante el NIRS en diversas pasturas resultó ser bastante precisa, tanto en muestra seca y fresca con coeficientes de determinación de 0.99 para la calibración, error estándar de calibración, SEC= 0.42, error estándar de validación SEP= 0.52 (Castro, 2002). Así mismo, durante la evaluación de forrajes, el análisis de regresión entre la química húmeda (método de referencia) y el método NIRS predijeron que el contenido de N de las hojas y tallos fue lineal con un coeficiente de determinación de 94% para las hojas y para los tallos fue de 91% (Dara *et al.*, 1991). En el análisis de forrajes y subproductos, se seleccionaron aleatoriamente diversos productos, donde se obtuvo un coeficiente de determinación y error estándar de calibración de 0,87 y 4.1, respectivamente para FDN y 0.93 y 1.5, respectivamente para PC (Reeves, 1994).

El análisis NIRS de especies forrajeras templadas como alfalfa, festuca alta, cebadilla de alfalfa, bermuda y digit grass pangola, obtuvo coeficientes de correlación de 99 % para PC (Norris *et al.*, 1976); cuando se determinó la PC en diferentes cortes de *Festuca arundinacea* se obtuvo un coeficiente de determinación de 96 a 98% (Blosser 1998).

Para el caso de determinación de PC en harina de yuca (*Manihot esculenta*), las ecuaciones evaluadas de calibración presentaron coeficientes de determinación superiores al 95%, y correlaciones por encima del 97%, alto poder de predicción, ya que

la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV) fue en todos los casos superior a 3 (Jiménez, 2007).

Para la determinación de la composición química en planta entera de maíz, se hallaron coeficientes de determinación en calibración (R^2_{cal}) de 0,94, 0,94, 0,91, y 0,90 para MS, proteína cruda (PC), fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) en MS, respectivamente (Cozzolino 2003).

En general, la determinación de los coeficientes de determinación de calibración r^2 se ubican en 98 % para PC, 93 % para FDA, 92 % para C, 90% para MS y 80% para FDN, en el análisis de alimentos para animales (Cozzolino en el 2002).

La técnica NIRS en los últimos años ha permitido analizar PC, FC, entre otros componentes de diversos tipos de alimentos generando curvas con un porcentaje de índice de correlación mayor a 90% en su mayoría de casos.

2.3.4. Transformación de espectros y cálculo de ecuaciones.

2.3.4.1. Desarrollo de calibraciones

Para estimar la composición química de una muestra, se requiere previamente hacer calibraciones, para lo cual se necesita contar con un conjunto amplio de muestras representativas de una misma población, coleccionar sus espectros, analizar las muestras mediante un método de referencia confiable, desarrollar las ecuaciones de calibración que relacionen los datos espectrales con los resultados del método de referencia y, finalmente, validar dichas ecuaciones con otras muestras de la misma población general, pero que no formen parte del set de calibración (Gabrielsen *et al*, 1988; Barber *et al.*, 1990; Garrido *et al*, 1993).

El set de muestras seleccionadas para desarrollar una calibración debe cumplir ciertas condiciones ideales: (Murray, 1988)

- Representar un rango amplio de composiciones o calidades.
- Tener una distribución uniforme y pareja (no normal) respecto de la población total.
- Ser típicas de las que se encuentren en la realidad.
- Contarse con datos precisos de su composición analítica.

Uno de los primeros aspectos que se plantean al desarrollar una calibración, es el número de muestras que será necesario incluir para obtener resultados satisfactorios. No existe un número mínimo definido, sino que éste dependerá de la entidad a predecir y de la naturaleza del producto a evaluar. Cuando se pretende analizar entidades químicas simples, de productos relativamente homogéneos, como es el nivel de nitrógeno (para estimar proteína bruta) en granos de trigo, puede bastar con 30 a 40 muestras; en cambio, si se pretende evaluar el contenido de proteína en productos más heterogéneos, o productos con mayores niveles y variedad de proteínas, se requieren más de 100 muestras (Shenk y Westerhaus, 1993).

Es importante destacar que se tiene la posibilidad de transferir calibraciones desarrolladas desde un equipo a otro. Dado que los aparatos presentan variaciones en sus lecturas, provenientes del mecanismo óptico, fuente emisora de luz, sustancias de referencia interna y en los detectores, es necesario estandarizarlos para corregir estas desviaciones. Ello es posible a través del uso de software especializado (Shenk y Westerhaus, 1991). Aunque esto abre interesantes posibilidades, se puede usar una calibración "importada", siempre que se trate del mismo tipo de muestras, ya que no se debe extrapolar en NIRS. Además, obliga a utilizar los mismos métodos de referencia y la misma manera de presentar la muestra a la lectura, en la operación de rutina posterior. Esto puede constituir una seria limitación para transferir ecuaciones de un lugar a otro,

debido a diferencias entre laboratorios en la forma de preparar las muestras y conducir los métodos analíticos. Parece interesante entonces, desarrollar ecuaciones de calibración de valor local y al mismo tiempo, estudiar el comportamiento de calibraciones externas (Alomar y Fuchslocher, 1997).

2.3.4.2. Cálculo de ecuaciones

Al desarrollar una calibración, se relaciona la información espectral con la información de referencia (composición química), definiendo entre otras cosas, el tratamiento matemático de los datos, el segmento del espectro a incluir y el método de regresión a emplear. Existen varias alternativas para modelar la relación entre los datos espectrales y los datos de referencia. Para esto se utiliza el análisis de regresión y entre las técnicas disponibles están la regresión múltiple, regresión múltiple paso a paso, componentes principales y cuadrados mínimos parciales. En general se encuentran mejores resultados con las últimas dos técnicas, en que se reduce toda la información espectral a un grupo más pequeño de variables independientes (componentes principales) y al mismo tiempo se controla el riesgo de sobreajuste (ISI, 1992).

2.3.4.3. Criterio de selección de ecuaciones

Las diferentes opciones de tratamientos matemáticos y técnicas de regresión permitirán disponer de muchas ecuaciones posibles para cada una de las variables a predecir. Es necesario entonces seleccionar aquella que se considere más confiable, es decir, que tenga un elevado coeficiente de determinación (R^2) y un bajo error estándar de calibración (SEC) (ISI, 1992).

El SEC corresponde en general al error estándar de la diferencia (ISI, 1992) y, aunque no tiene una forma de expresión universalmente empleada, al parecer la más aceptada (Davies y Grant, 1987; Murray, 1993; ISI, 1992) es:

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum(y-x)^2}{n_c - t - 1}}$$

Donde:

y = es el valor de referencia (laboratorio).

x = Valor predicho por NIRS.

n_c = Número de muestras en el set de calibración.

t = Número de términos en la ecuación de regresión.

Una vez seleccionada una o más ecuaciones, deben someterse a prueba con una muestra independiente de validación, que no debe formar parte del grupo de calibración. Al predecir un set de muestras externas para validación, se calcula también un R^2 y, con los desvíos de los valores predichos respecto de los valores de referencia, se calcula un error estándar de predicción, o performance, (SEP) que en general se acepta como:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum(y-x)^2}{n_v - 1}}$$

Dónde:

y = es el valor de referencia (laboratorio).

x = Valor predicho por NIRS.

n_v = número de muestras en el set de validación.

El SEP es un indicador confiable de la calidad de la ecuación desarrollada, ya que a diferencia del SEC, que mejora (disminuye) a medida que se le agregan nuevos términos a la ecuación, el SEP mejora sólo hasta que comienza a producirse un sobreajuste de la ecuación, aumentando (empeorando) posteriormente con cada nuevo término (Westerhaus, 1989).

El SEP siempre será algo mayor que el SEC, pero como criterio general, se puede afirmar que una ecuación es considerada como aceptable cuando la magnitud del SEP es menor a un tercio de la desviación estándar de los datos de referencia (Kennedy *et al*, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y las muestras de Rye grass son procedentes del valle del Mantaro.

El valle del Mantaro es uno de los más fértiles y poblados del Perú. Es una planicie ancha, de mayor extensión en la sierra peruana y ocupa la parte meridional del departamento de Junín, tiene una longitud de 60 km y de ancho de 2 a 4 km; esta flanqueado por dos cordilleras montañosas. El clima es templado con una temperatura promedio anual de 10,8 °C y el piso de valle se encuentra a 3000-3300 msnm (Ordoñez *et al.*, 2011).

3.2 Características de la muestras

Se utilizaron 29 muestras de Rye grass de diferente tiempo de crecimiento (2 a 14 semanas), se secaron a 60°C durante 48 horas para la determinación de materia seca, después fueron molidas con un molino Wille usando una criba de 1 mm (Garrido *et al.*, 2000). Finalmente se almacenaron en bolsas herméticamente cerradas hasta su análisis y la obtención del espectro.

3.3 Análisis proximal

Se utilizó el análisis Proximal como análisis de referencia para las determinaciones de proteína cruda, fibra bruta, extracto etéreo y cenizas haciendo uso del protocolo establecido por la AOAC (1990). Las 29 muestras fueron analizadas en su composición química, mediante los métodos de Análisis Proximal anteriormente mencionados.

3.4 Metodología NIRS

3.4.1 Preparación de muestras

Las muestras de Rye grass, secas y molidas a través de una criba de 1 mm fueron “escaneadas” en modo de reflectancia para la captura del espectro. Cada muestra fue presentada al espectrofotómetro Thermo Antaris II FT-NIR Analyzer; para el manejo de la base de datos de los espectros, se utilizó el Software de TQ Analyst TM *. Los datos de reflectancia se guardaron como el logaritmo (1/R) (donde R= reflectancia) a 3.8567 nm de intervalo. La luz difusa reflejada (R) por la muestra fue registrada en detectores de sulfuro de plomo, amplificada, digitalizada, transformada y enviada a una computadora para su almacenamiento y procesamiento. En forma paralela a la señal

digital de luz reflejada, la computadora recibió una señal que representa la longitud de onda utilizada, de modo que a cada valor de reflectancia almacenada, le corresponde una longitud de onda (Alomar y Fuchslocher, 1998).

3.4.2 Ecuación de calibración

Las ecuaciones de calibración se obtuvieron mediante regresión cuadrados mínimos parciales y regresión de componentes principales entre los datos espectrales y los resultados del análisis convencional utilizando la región del espectro comprendida entre 3999.640 y 10001.028 cm^{-1} previa corrección de los efectos de dispersión de la luz mediante el tratamiento SNV (Standard normal variate) y de-trend, descrito por Barnes *et al.* 1993. Todas las operaciones de obtención, registro y selección de espectros y obtención y validación de ecuaciones de calibración NIRS se realizaron mediante el programa TQ Analyst TM *.

Para mejorar el coeficiente de correlación se eliminan los puntos alejados de la línea de calibración. La reproducibilidad y exactitud del análisis NIRS, depende del tipo de instrumento, de la manera de operarlo, de las características espectrales de la muestra y de las técnicas analíticas de referencia. El conjunto de valores de diferentes longitudes de onda para una muestra constituye su espectro que representa la “huella dactilar” o “espectro” típico o representativo de la muestra. En este estudio se desarrollaron las ecuaciones de calibración y predicción usando los métodos estadísticos de Cuadrados Mínimos Parciales y Regresión de Componentes Principales.

Las ecuaciones de regresión fue la siguiente:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n$$

Donde:

Y; representa el parámetro químico o característica (PC, FC, EE, Cenizas)

b_0 ; es el intercepto

b_1 a b_n ; los coeficientes de la regresión

x_1 a x_n ; absorbancias a diferentes longitudes de onda. Las ecuaciones de calibración fueron seleccionadas sobre la base de minimizar el error estándar de la calibración (SEC). El error estándar de la calibración y el de la validación fueron calculados por el programa mediante la fórmula:

$$SEC/V: [(Quim - NIRS)^2 / (n - t - 1)]^{1/2}$$

Donde:

Quim es el valor del método de referencia

NIRS: valor de predicción NIRS

n: numero de muestras en la calibración

t: numero de términos del modelo de calibración (Shenk y Westerhaus, 1993).

Se utilizó la eliminación de datos atípicos y un GH (GH: distancia de Mahalanobis) >3 fueron consideradas atípicas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis proximal

La composición química de las muestras de Rye grass evaluadas (Cuadro 3) reflejo la variación propia debido al tiempo de crecimiento de las muestras empleadas en el presente estudio. Los resultados para PC tuvieron un máximo de 25.93 % superior al máximo reportado por Calsamiglia y Ferret (2004) e inferior al máximo reportado por Petisco (2006). La cantidad de PC mínima fue de 9.16 % inferior al menor porcentaje reportado por Calsamiglia y Ferret (2004).

Cuadro 3. Composición química (%) de las muestras de Rye grass analizadas

Nutriente	N	Mínimo	Máximo	Media	SD
PROTEÍNA CRUDA	29	9.16	25.93	15.87	4.26
FIBRA BRUTA	29	12.86	25.33	18.84	2.86
EXTRACTO ETÉREO	29	0.69	2.76	1.76	0.56
CENIZAS	29	6.27	15.09	10.84	2.53

N: Número de muestras, SD: Desviación Estándar, % en base a Materia Seca.

La fibra cruda (FB) tuvo un promedio de 18.84 % (12.86 – 25.33 %), el extracto etéreo (EE) de 1.76 % (0.69 - 2.76 %) y la cenizas de 10.84 % (6.27 - 15.09 %). Calsamiglia y Ferret (2004), reportan valores mayores para FB y EE y valores menores para el contenido de cenizas.

Los resultados reportados, muestran la gran variación existente en la composición nutricional del Rye grass; dada especialmente por el tiempo de crecimiento. Así mismo, un aspecto importante a tomar en cuenta es la procedencia de las muestras analizadas, IVITA - Mantaro; las condiciones de valle interandino donde esta se encuentra ubicada esta estación influye notablemente en la composición química del Rye grass. La información sobre la composición química del Rye grass es amplia y la calidad va estar influenciada por diversos factores, como el tiempo de descanso, el tipo de suelo, la variedad utilizada, el lugar de cultivo, etc.

Los resultados observados muestran que a medida que el contenido de PC es mayor, encontramos un menor contenido de FB, demostrándose la relación inversamente proporcional entre estos dos nutrientes.

4.2 Calibración

En la figura 1, se muestra los espectros hallados de las diferentes muestras de Rye grass analizados.

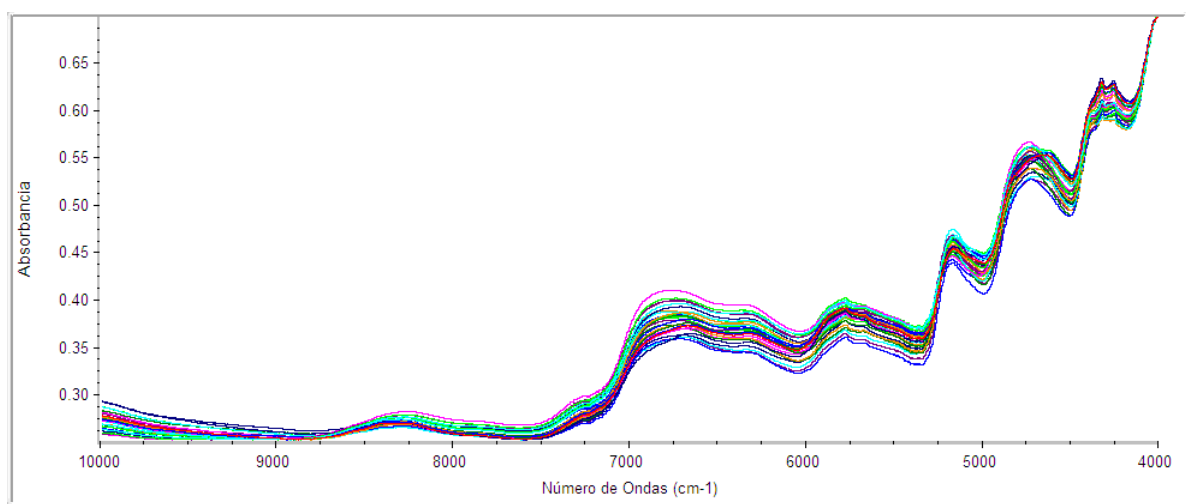


Figura 1. Compendio de espectros NIRS de Rye grass (29 muestras).

En el cuadro 4, se muestra el mejor tratamiento matemático, coeficiente de correlación, coeficiente de determinación y desviación estándar de calibración (SEC) encontrado para cada nutriente evaluado. Se observa que para PC y EE se obtiene el mejor coeficiente de determinación usando la regresión por componentes principales (PCR) y para FB y cenizas usando Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). Así mismo, se observa que para PC y ceniza el mejor coeficiente de determinación se obtiene usando la primera derivada, mientras que para FB y EE con la segunda derivada.

Cuadro 4. Ecuaciones de calibración

Nutriente	Tratamiento Matemático	R	R ²	SEC	Región (cm ⁻¹)
PC*	PCR, Derivada 1	0.9797	0.9598	0.841	5 199.15-4 936.87
					7 119.90-6 903.91
FB	PLS, Derivada 2	0.9490	0.9006	0.888	4 458.61-4 396.90
					5 380.42-5 203.00
					5 785.40-5 735.26
EE	PCR, Derivada 2	0.9084	0.8252	0.232	4 292.77-4 103.78
					5 014.01-4 786.45
					6 541.36-5 866.40
C	PLS, Derivada 1	0.9738	0.9483	0.565	6 367.45-5 994.10
					5 025.58-4 786.45
					6 741.92-6 410.22

*PC = Proteína cruda, FB= Fibra bruta, EE = Extracto etéreo, C = ceniza, SEC = Error estándar de calibración, R = Coef. Correlación, R² = Coef. Determinación, PCR = Regresión de componentes principales, PLS = Mínimos cuadrados parciales.

Para lograr encontrar los mejores tratamientos matemáticos, coeficientes de correlación, coeficientes de determinación y desviaciones estándar de calibración para cada nutriente evaluado; se determinaron diferentes regiones del espectro de cada muestra evaluada. Para PC, se trabajaron con dos regiones (5199.15 - 4936.87 cm^{-1} y 7119.90 - 6903.91 cm^{-1}); para FB con tres regiones (4458.61 - 4396.90 cm^{-1} , 5380.42 - 5203.00 cm^{-1} y 5785.40 - 5735.26 cm^{-1}); para EE con tres regiones (4292.77 - 4103.78 cm^{-1} , 5014.01 - 4786.45 cm^{-1} y 6541.36 - 5866.40 cm^{-1}) y para ceniza con tres regiones (6367.45 - 5994.10 cm^{-1} , 5025.58 - 4786.45 cm^{-1} y 6741.92 - 6410.22 cm^{-1}). Como se observa, para cada nutriente varió la región utilizada; esto debido a los elementos estructurales de los grupos funcionales de cada nutriente específico (Shenk y Westerhaus, 1995). Así mismo, el número de regiones utilizadas dependerá de las diversas combinaciones de los grupos funcionales (Cozzolino *et al.*, 2002).

El mejor tratamiento matemático a utilizarse depende del nutriente a evaluar, la concentración de nutriente, el tipo de forraje, etc., por ello, para cada nutriente que evaluamos tenemos diferente tratamiento matemático. Los mejores coeficientes de determinación para el caso de PC en un mix de diferentes pasturas fueron conseguidos utilizando el método de Cuadrados Mínimos Parciales Modificados (Sandoval, 2008), mientras en el presente estudio el método utilizado para obtener un mejor R^2 en PC el PCR.

Por otro lado, el coeficiente de determinación de la ecuación de predicción de PC fue alta (0.96), concordando con los reportes para diversos alimentos usados por animales (Cozzolino *et al.*, 2002) y para diversos forrajes (Valenciaga, 2007). En otros forrajes, como alfalfa (*Medicago sativa* L.) y sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) se observó igual comportamiento (Pires y Prates, 1998; Saliba *et al.*, 2003). El análisis de PC mediante el NIRS en diversas pasturas resultó ser bastante precisa, tanto en muestra seca y fresca con altos coeficientes de determinación ($R^2 = 0.99$) para la calibración, error estándar de calibración, SEC= 0.42, error estándar de validación SEP= 0.52 (Castro, 2002). Para el caso de determinación de PC en harina de yuca (*Manihot esculenta*), las ecuaciones evaluadas de calibración presentaron coeficientes de

determinación superiores al 95%, y correlaciones por encima del 97%, alto poder de predicción, ya que la relación entre la desviación estándar del análisis químico y el error estándar de la validación cruzada (SD/SECV) fue en todos los casos superior a 3 (Jiménez, 2007). Norris y colaboradores pudieron encontrar en el análisis NIRS de especies forrajeras templadas como Alfalfa, Festuca alta, Cebadilla de alfalfa, bermuda y Digit grass pangola, coeficientes de correlación de 99 % para PC. Blosser en 1998, obtuvo un coeficiente de determinación de 96% al 98%, cuando se determinó la PC en diferentes cortes de *Festuca arundinacea*.

Al realizar la correlación entre los datos de laboratorio obtenidos para PC, FB, EE y Cenizas y los datos predichos al aplicar las ecuaciones a los espectros generados. Se obtuvieron los r^2 y SEC que se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Comparativo de valores analizados con método proximal y NIRS.

Nutriente	PC		FB		EE		C	
	Proximal	NIRS	Proximal	NIRS	Proximal	NIRS	Proximal	NIRS
Media	15.87	15.87	18.83	18.83	1.75	1.76	10.83	10.83
Valor Inferior	9.16	9.62	12.86	13.25	0.69	0.97	6.27	5.97
Valor Superior	25.93	25.6	25.33	25.91	2.76	2.67	15.09	14.73

PC = Proteína cruda, FB= Fibra bruta, EE = Extracto etéreo, C = ceniza

Se puede apreciar también que los valores de las medias del grupo de PC, EE, FB y cenizas encontrados por análisis proximal y el encontrado por predicción NIRS son bastante cercanos, esto debido al alto valor de R^2 establecido para las ecuaciones de calibración. La experiencia en la valoración de diversos henos mediante el NIRS para predecir la PC y ceniza fue buena; regulares para FDN e inferiores para FDA y MS (Cazzolino, 2006). Asimismo, el uso del NIRS en pastos cultivados tropicales de América Central permitió obtener altos coeficientes de determinación (R^2) y bajos errores estándar de validación (EEV) para PC, FDA y FDN (Sandoval *et al.*, 2008).

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones del estudio realizado concluimos:

1. Las ecuaciones de calibración NIRS obtenidas permiten una buena predicción cuantitativa de proteína cruda, fibra bruta, extracto etéreo y cenizas de Rye grass.
2. Los estadísticos obtenidos muestran que se encuentran mejores coeficientes de determinación para el caso de proteína cruda y cenizas, y menores valores de error estándar de calibración para el caso de fibra bruta y extracto etéreo.

VI. RECOMENDACIONES

1. Adicionar más muestras de pasturas con un rango de edad más amplio, pasturas más jóvenes y pasturas maduras a fin de mejorar las curvas de predicción.
2. Extender los estudios para determinación de curvas de calibración en diversos tipos alimenticios a fin de utilizar el NIRS como rutina analítica de composición nutricional de los alimentos.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1. Alomar D. y Fuchslocher R. 1997.** Fundamentos de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. Agrosur, Vol 26, N°1, Valdivia, Chile.
- 2. Alagón H. 2002.** Alimentación Animal. Texto Universitario. Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco. Carrera profesional de zootecnia. Cusco-Perú.
- 3. Agudelo G. 2001.** Fundamentos de nutrición animal aplicada. Primera Edición, Editorial de Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- 4. AOAC. 1990.** Official methods of analysis. *In* Helrich, K. (ed.) 15th. ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.
- 5. Blosser, T. H. Reeves, III. And Bond, J. 1988.** Factor Affecting Analysis of the Chemical Composition of Tall Fescue with Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Journal of Dairy Science Vol. 71, No. 2. 398-407.

6. **Bojórquez C., Rojas J. y Ordoñez J. 2015.** Pastos Cultivados en el Valle del Mantaro. Publicación de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura – IVITA Mantaro. Lima, Perú.
7. **Bondi A. 1988.** Nutrición animal. Primera edición. Editorial Acribia S: A: Zaragoza, España.
8. **Brown, W. F. Moore, J. E. Kunkle, W. E. Chambliss, C. G. and Portier K. M. 1990.** Forage Testing Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. Journal of Animal Science, Vol. 68. 1416-1427.
9. **Cajarville, C. Repetto, J. Curbelo, A. Soto, C & Cozzolino, D. 2003.** Determination of dry matter (DM) and nitrogen (N) degradability in forages by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Proc. British Society of Anim. Sci. Annual Meeting. USA. p. 154.
10. **Calsamiglia, S. Ferret, A. Bach. 2004.** Tablas FEDNA de valor nutritivo de Forrajes y Subproductos fibrosos húmedos. Fundación para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, 70 pp.
11. **Cañas R. 1998.** Alimentación y nutrición animal. Impreso en Chile. Publicación de la Facultad de Agronomía Pontificia Universidad Católica de Chile.
12. **Castro P. 2002.** Use of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for forage analysis. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. REU Technical Series No.64. La Coruña. España. 225p.
13. **Cozzolino, D. 2002.** Uso de Espectroscopía de reflectancia en infrarrojo cercano para análisis dealimentos animales. Agrociencia 6: 25-32p.
14. **Cozzolino, D. Fassio, A. y Fernandez, E. 2003.** Uso de la espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano para el análisis de calidad de ensilaje de maíz. Agric. Tec. (Chile) 63: 387-394.

15. **Cozzolino D., Fernández E., Restaino E. y La Manna A. 2006.** Determinación de la composición química de heno mediante la espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Estación Experimental INIA La Estanzuela. Uruguay. 203-207p.
16. **Church D., Pond W. y Pond K. 2002.** Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 2da. Edición. Editorial Limusa. México. 25p.
17. **Dara, S., Berdahl, J. and Karn, J. 1991.** Forage Quality Analysis Using Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). Technology in North Dakota. North Dakota Farm Research. 48 (5): 6-7
18. **Davies, A. y Grant, A. 1987.** Review: Near infrared analysis of food. J. Food Sci. Tech. 22:191p.
19. **Deaville, E.R & Flinn, P.C. 2000.** NIRS: An alternative approach for the estimation of forage quality and voluntary intake. En: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Eds. D.I Givens, R.F.E. Owen, H.M. Axford. CABI. Publishing, UK. p. 301
20. **De la Roza, B. 1993.** Utilización de la espectroscopia en el infrarrojo cercano para el análisis de forrajes y materias primas. Programa de pastos y forrajes. Instituto de Experimentación y Promoción Agraria. Consejería de medio rural y pesca. Serie Informes Técnicos nº. 2 / 93. Principado de Asturias.
21. **Gabrielsen, B.C., Vogel, K. P. and Knudsen, D. 1988.** Comparison of in vitro dry matter digestibility and cellulose digestion for deriving near infrared reflectance spectroscopy calibration equations using coolseason grasses. Crop. Sci. 28:44.
22. **Garrido, V.A, Pérez, M.D, Guerrero, J.E y Gómez, C.A. 2000.** Avances en la utilización de la tecnología NIRS, aplicaciones en producción animal. Universidad Politécnica de Córdoba, España.
23. **Givens, D.I., y Deaville, E.R. 1999.** The current and future role of Near Infrared Reflectance Spectroscopy in animal nutrition. Review. Aust. J. Agric. Res. Vol 50.

24. **Goering H, Van Soest PJ. 1970.** Evaluación de la fibra en los forrajes. Folleto traducido por Pezo, Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima, Perú.
25. **Greenfield, H. y Southgate, D. 2003.** Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma
26. **Hall, M. 1992.** Agronomy facts 19: Rye grass. College of Agricultural Science. The Pennsylvania State University.
27. **Henneberg, W. y Stohmann, F. 1860, 1864.** *Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer I & II.* Braunschweig.
28. **ISI. 1992.** NIRS 3. Routine operation, Calibration and Network system Management Software for Near Infrared Instruments. Infrasoftware International. Perstorp Analytical Inc., Silver Spring, MD 20904, 328 p.
29. **Jimenez, P. 2007.** Identificación de Harinas de Yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con alto contenido proteico mediante espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS). Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de Maestra en Ciencias Agrarias con énfasis en Producción Animal Tropical. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. 2,39p.
30. **McDonal P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. 2006.** Nutrición animal 6ª ed. Zaragoza: Acribia, S.A.
31. **Murray, I. 1993.** Forage analysis by near infrared spectroscopy. In: Recent Advances in Animal Nutrition. Edited by W. Haresign and D. J. A. Cole Studies in the Agricultural and Food Sciences. Butterworths. 141-156.
32. **Norris K. H., Barnes R. F., Moore J. E. y Shenk J. S. 1976.** Predicting forage quality by infrared reflectance spectroscopy. Journal of Animal Science, Vol. 43, No. 4.
33. **Ordoñez J. y Bojórquez C. 2011.** Manejo del establecimiento de pasturas para zonas altoandinas del Perú. Editorial CONCYTEC. Huancayo. Perú.

34. **Petisco, C.; García-Criado, B.; García-Criado, L.; García-Ciudad, A., 2006.** Prediction of protein in fresh leaves of alfalfa by NIRS with an interactance-reflectance probe En Sustainable Grassland Productivity. Lloveras et al. (Eds.), Grassland Science in Europe, vol. 11, 568-570.
35. **Pond WG, Church DC, Pond KR. 2010.** Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Segunda edición. Editorial Limusa. México.
36. **Reeves, J. 1994.** Use of Near Infrared Reflectance Spectroscopy as a Tool for Screening Treated Forages and By-products. Journal of Dairy Science Vol. 77, No. 4.
37. **Saliba, E.O.S., Gontijo Neto, M.M., Rodríguez, N.M., Miranda, L.F., Obeid, J.A., Teixeira, G.L. & Oliveira, M.A. 2003.** Prediction of sorghum chemical composition by near infrared spectroscopy technique. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 55: 357.
38. **Sandoval L., Bueso F. y Vélez M. 2008.** Predicción nutricional para pastos tropicales por espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano. Agronomía Mesoamericana 19(2): 221-225p.
39. **Shenk, J. S. and Westerhaus, M. O. 1991.** Population definition, sample, and calibration procedures for near infrared reflectance spectroscopy. Crop Sci. 31: 469-474.
40. **Shenk, J. S. and Westerhaus, M. O. 1993.** Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Monograph. Infrasoftware International. Part Matilda, P. A. USA.*
41. **Shenk, J. S. and Westerhaus, M. O. 1995.** The application of near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to forage analysis. En: Forage Quality. Evaluation and Utilization Eds. Fahey, G. C. Madison, USA. WI p. 406.
42. **SOLID OPD. 2010.** Tecnología productiva de lácteos. Producción de pastos y forrajes. Primera edición. Perú.

- 43. Valenciaga D. y Saliba S. 2006.** La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) y sus potencialidades para la evaluación de forrajes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 40, No. 3. 259-267p.
- 44. Valenciaga, D.; De Oliveira Simoes, E.; La O., O.; Chongo, B.; Oramas, A.; Cairo, J. G. 2007.** Obtención de las curvas de calibración para la determinación de la composición química de la especie *Pennisetum purpureum* mediante la Espectroscopia de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS) Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Vol. 41, No. 2. pp. 165-168.
- 45. Widhan, W. R. Mertens, D. R. and Barton, F. E. 1989.** Protocol for NIRS calibrations: sample selection and equation development and validation. En: Definition of NIRS analysis. NIRS: Analysis of forage quality. Washington, USD. P. 50.

ANEXO

Cuadro 6. Composición químicaa (% en base a materia seca) de las muestras de Rye grass evaluadas mediante análisis proximal.

Numero muestra	Código	Proteína cruda (%)	Fibra bruta (%)	Extracto etéreo (%)	Ceniza (%)
1	i2888.spa	10.58	20.56	0.69	10.74
2	i2889.spa	14.94	20.27	1.52	14.84
3	i2890.spa	12.68	14.34	1.66	8.81
4	i2891.spa	18.68	19.62	2.22	14.35
5	i2895.spa	10.78	12.86	1.08	6.66
6	i2983.spa	19.84	18.33	1.35	10.36
7	i2981.spa	20.24	18.91	2.37	13.61
8	i2982.spa	12.25	19.95	1.48	7.59
9	i2984.spa	19.85	18.49	2.01	11.51
10	i2985.spa	9.16	22.66	1.19	6.27
11	i2986.spa	25.93	18.59	2.57	15.09
12	i2987.spa	19.54	18.97	2.76	13.48
13	i2988.spa	17.58	18.45	2.7	10.45
14	i2989.spa	22.48	18.59	2.3	13.66
15	i2990.spa	12.01	25.33	1.47	8.06

16	i2991.spa	13.16	18.62	1.29	8.47
17	i2992.spa	13.93	17.1	1.94	10.74
18	i2993.spa	20.95	19.82	2.46	12.94
19	i2934.spa	22.56	17.99	1.99	13.22
20	i2937.spa	14.01	21.49	1.8	12.17
21	i2935.spa	15.32	22.48	2.15	11.62
22	i2939.spa	17.41	22.97	2.33	11.57
23	i2896.spa	12.96	21.11	1.12	13.65
24	i2897.spa	13.87	14.73	1.6	8.86
25	i2898.spa	14.76	15.16	1.26	8.58
26	i2899.spa	10.96	13.45	0.92	8.59
27	i2892.spa	15.81	18.38	2.13	10.32
28	i2893.spa	16.98	17.43	1.35	9.52
29	i2894.spa	10.96	19.59	1.38	8.52

FIGURA 2.- a) Curva de calibración de proteína cruda.

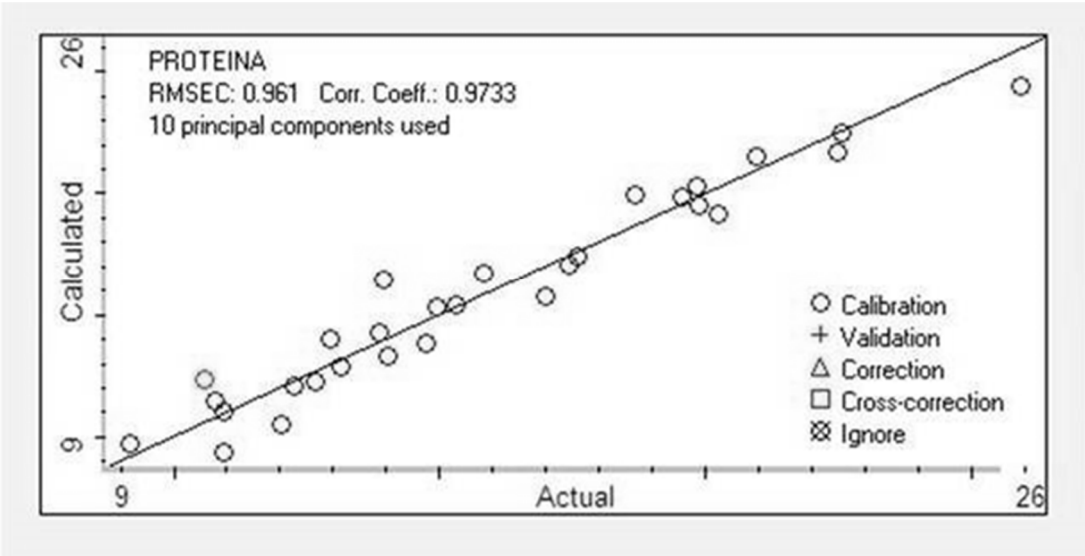


FIGURA 2.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de proteína cruda.

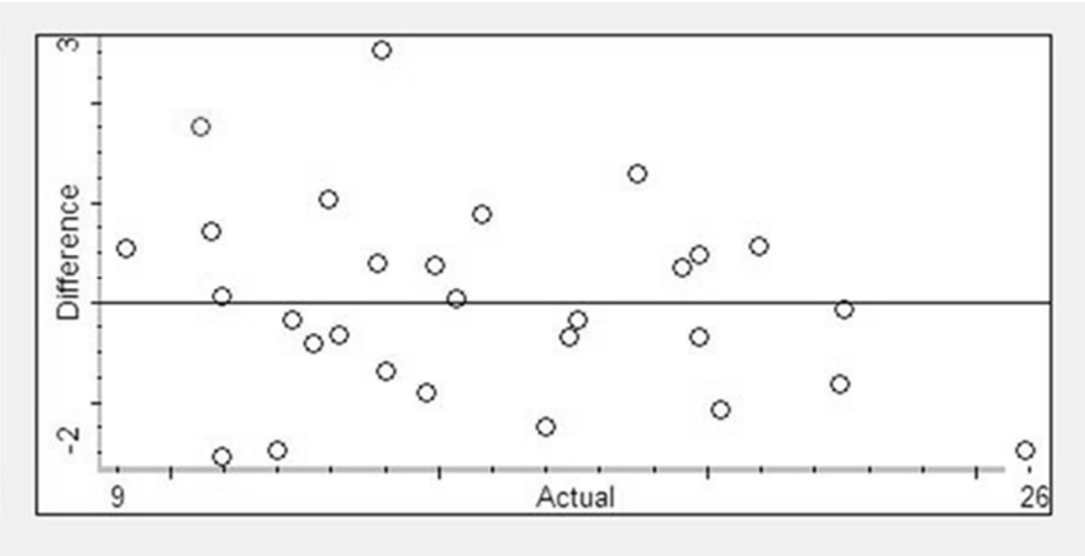


FIGURA 3.- a) Curva de calibración de fibra bruta.

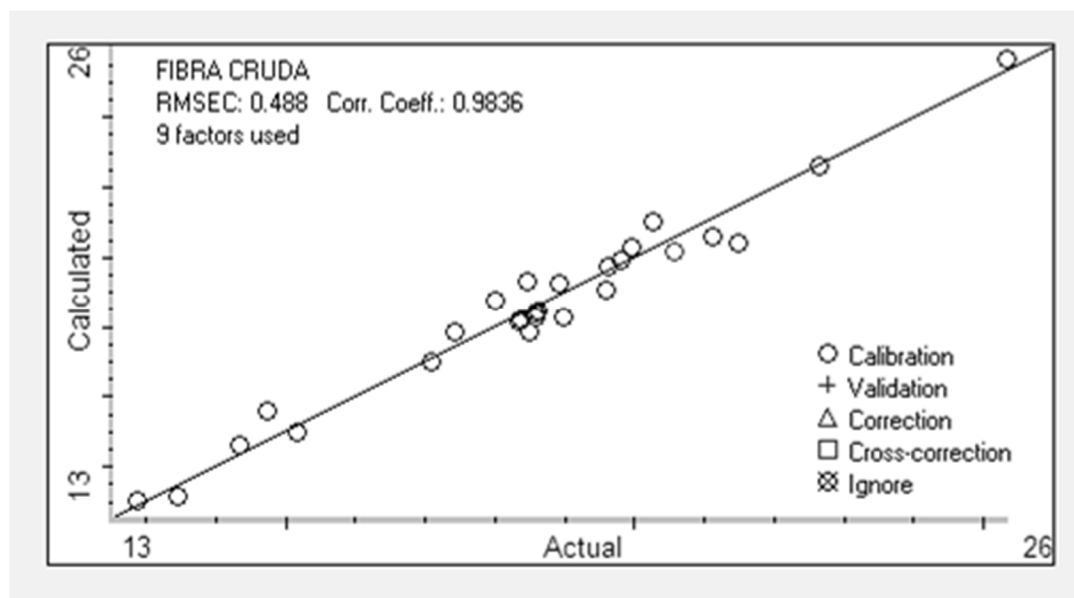


FIGURA 3.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de fibra cruda.

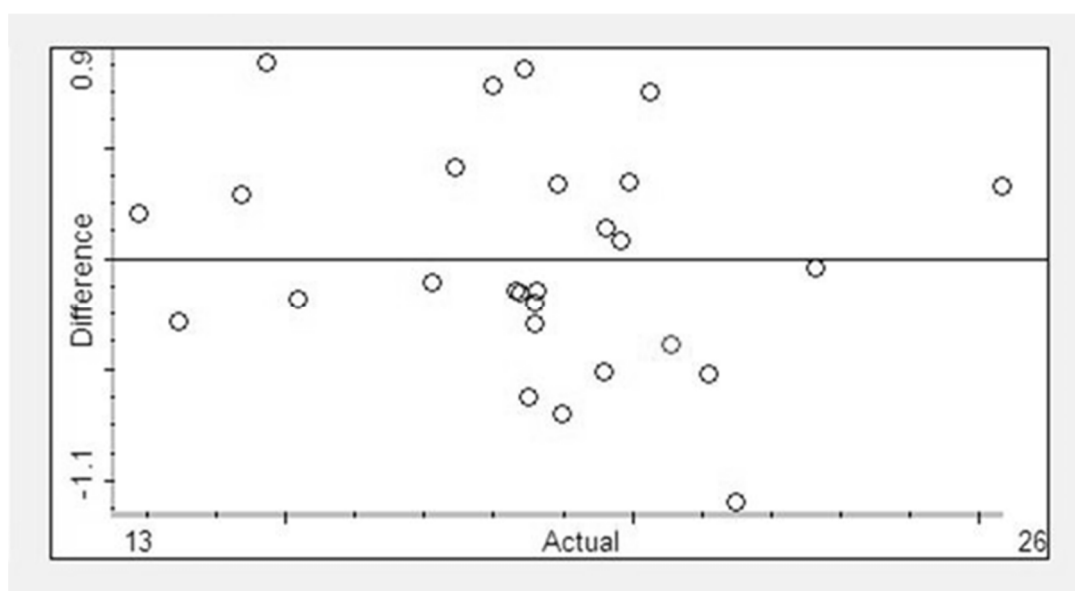


FIGURA 4.- a) Curva de calibración de extracto etéreo.

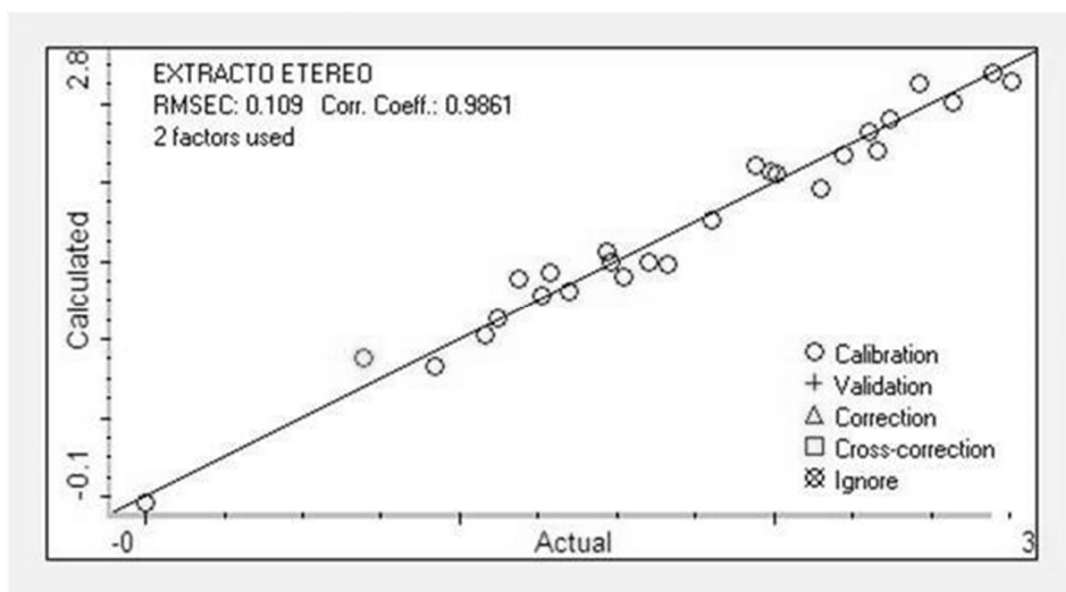


FIGURA 4.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de extracto etéreo.

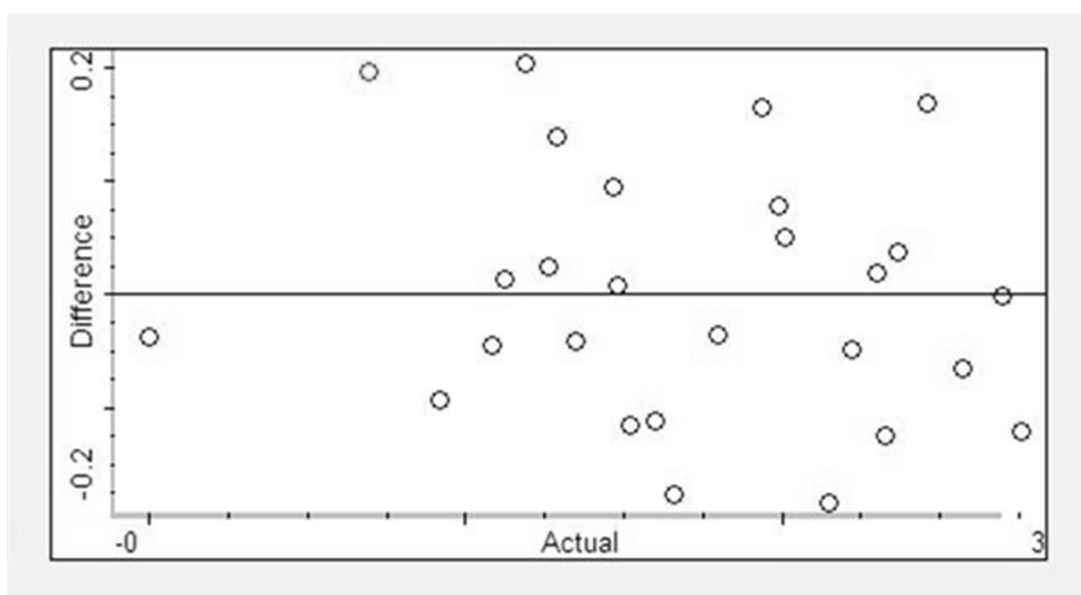


FIGURA 5.- a) Curva de calibración de ceniza.

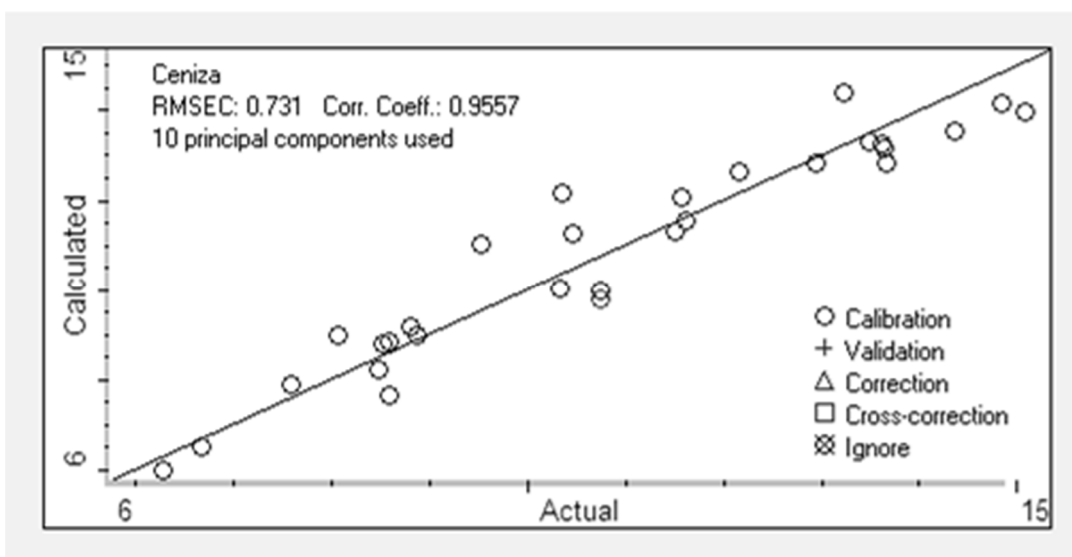
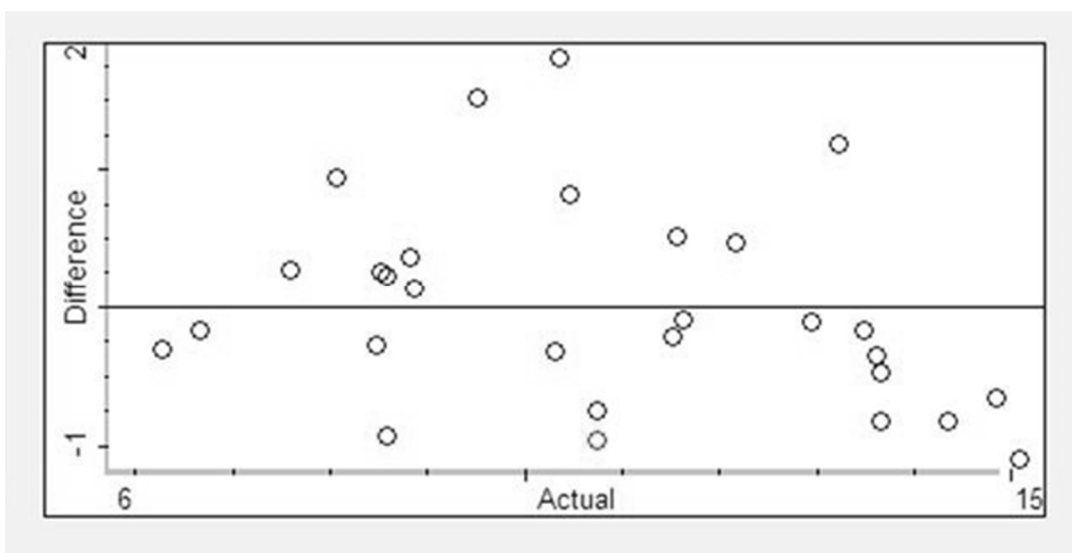


FIGURA 5.- b) Diferencia entre valor estándar y valor estimado de ceniza.



Cuadro 7. Diferencia de contenido de ceniza hallado por análisis proximal y por NIRS.

Muestra	Proximal	NIRS
1	10.74	10.42
2	14.84	14.73
3	8.81	8.71
4	14.35	13.73
5	6.66	6.6
6	10.36	11.88
7	13.61	13.63
8	7.59	7.86
9	11.51	11.18
10	6.27	5.97
11	15.09	13.96
12	13.48	13.7
13	10.45	10.53
14	13.66	12.81

15	8.06	8.47
16	8.47	9
17	10.74	10.58
18	12.94	12.94
19	13.22	14.21
20	12.17	12.26
21	11.62	11.36
22	11.57	11.75
23	13.65	13.46
24	8.86	9.07
25	8.58	8.4
26	8.59	7.7
27	10.32	10.01
28	9.52	10.77
29	8.52	8.56

Cuadro 8. Diferencia entre contenido de PC hallado por análisis proximal y por NIRS

Muestra	Proximal	NIRS
1	10.58	11.22
2	14.94	14.56
3	12.68	11.41
4	18.68	20.13
5	10.78	10.69
6	19.84	20.62
7	20.24	19.05
8	12.25	12.7
9	19.85	18.98
10	9.16	9.62
11	25.93	25.6
12	19.54	20.46
13	17.58	17.02
14	22.48	21.59

15	12.01	11.86
16	13.16	13.3
17	13.93	16.27
18	20.95	20.79
19	22.56	22.35
20	14.01	13.96
21	15.32	15.31
22	17.41	16.37
23	12.96	14.4
24	13.87	14.09
25	14.76	14.57
26	10.96	10.35
27	15.81	16.42
28	16.98	15.86
29	10.96	10.61

Cuadro 9. Diferencia entre contenido de EE hallado por análisis proximal y por NIRS.

Muestra	Proximal	NIRS
1	0.69	1.01
2	1.52	1.43
3	1.66	1.35
4	2.22	2.12
5	1.08	1.18
6	1.35	1.67
7	2.37	2.13
8	1.48	1.36
9	2.01	2.1
10	1.19	0.99
11	2.57	2.67
12	2.76	2.22
13	2.7	2.32
14	2.3	2.41

15	1.47	1.52
16	1.29	1.58
17	1.94	2.39
18	2.46	2.44
19	1.99	2.16
20	1.8	2.08
21	2.15	1.97
22	2.33	2.27
23	1.12	1.38
24	1.6	1.31
25	1.26	1.24
26	0.92	0.97
27	2.13	2.03
28	1.35	1.64
29	1.38	1.16

Cuadro 10. Diferencia entre contenido de FC hallado por análisis proximal y por NIRS

Muestra	Proximal	NIR
1	20.56	20.06
2	20.27	21.42
3	14.34	15.13
4	19.62	20.59
5	12.86	13.27
6	18.33	18.03
7	18.91	19.57
8	19.95	20.27
9	18.49	17.98
10	22.66	22.75
11	18.59	18.49
12	18.97	18.75
13	18.45	19.87
14	18.59	18.39

15	25.33	25.91
16	18.62	18.72
17	17.1	17.88
18	19.82	20.07
19	17.99	18.83
20	21.49	21.21
21	22.48	19.56
22	22.97	20.77
23	21.11	20.72
24	14.73	15.28
25	15.16	14.56
26	13.45	13.25
27	18.38	17.94
28	17.43	17.77
29	19.59	19.2

Cuadro 11. Estadísticos de calibración obtenidos por MPLS y PCR para la estimación de PC, FC, EE y cenizas.

<i>TM</i>	<i>PC</i>			<i>FC</i>			<i>EE</i>			<i>C</i>	
	R	RMSEC		R	RMSEC		R	RMSEC		R	RMSEC
1,5,5	0.9790	0.854		0.9254	1.07		0.8917	0.251		0.9557	0.731
2,5,5	0.9759	0.914		0.9451	0.920		0.9084	0.232		0.9393	0.852
1,7,7	0.9796	0.842		0.9240	1.08		0.8941	0.248		0.9589	0.704
<i>PCR</i> 2,7,7	0.9770	0.893		0.9319	1.02		0.9042	0.237		0.9444	0.816
1,9,9	0.9797	0.841		0.9223	1.09		0.8950	0.247		0.9634	0.665
2,9,9	0.9766	0.901		0.9302	1.03		0.8996	0.242		0.9487	0.784
1,5,5	0.9491	1.32		0.9267	1.06		0.7556	0.363		0.9597	0.698
2,5,5	0.9757	0.918		0.9387	0.970		0.8210	0.317		0.9022	1.07
1,7,7	0.9491	1.32		0.9265	1.06		0.7538	0.364		0.9738	0.565
<i>PLS</i> 2,7,7	0.9778	0.878		0.9490	0.888		0.7831	0.345		0.9016	1.07
1,9,9	0.9490	1.32		0.9246	1.07		0.7521	0.366		0.9610	0.686
2,9,9	0.9562	1.23		0.9295	1.04		0.7811	0.346		0.9483	0.788

TM: Tratamiento Matemático. (Derivada, gap, smoot)